



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – FANAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS – PPGCN
MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS – MCN



ANA PAULA DE FREITAS BEZERRA

**ESTUDO ELETROANALÍTICO DO ESTROGÊNIO DIENESTROL EM
ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE
PRATA OBTIDAS POR TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**

MOSSORÓ-RN

2019

ANA PAULA DE FREITAS BEZERRA

ESTUDO ELETROANALÍTICO DO ESTROGÊNIO DIENESTROL EM ELETRODO
QUIMICAMENTE MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
OBTIDAS POR TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

Dissertação apresentada à comissão julgadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais (PPGCN) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais, na linha de pesquisa de Tecnologias Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Mielle B. F. Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Suely S. L. Castro

MOSSORÓ-RN

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do(a) autor(a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu(a) respectivo(a) autor(a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Catálogo da Publicação na Fonte.
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

F866e FREITAS BEZERRA, ANA PAULA DE
ESTUDO ELETROANALÍTICO DO ESTROGÊNIO
DIENESTROL EM ELETRODO QUIMICAMENTE
MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
OBTIDAS POR TRATAMENTO HIDROTÉRMICO. / ANA
PAULA DE FREITAS BEZERRA. - UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO RIO GRANDE DO NORTE, 2019.

47p.

Orientador(a): Prof. Dr. THIAGO MIELLE BRITO
FERREIRA OLIVEIRA.

Coorientador(a): Prof. Dr. SUELY SOUZA LEAL
CASTRO.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-
Graduação em Ciências Naturais). Universidade do Estado
do Rio Grande do Norte.

1. ESTROGÊNIOS SINTÉTICOS. 2. SENSORES
ELETRQUÍMICOS. 3. DETERMINAÇÃO
ELETROANALÍTICA. I. BRITO FERREIRA OLIVEIRA,
THIAGO MIELLE. II. Universidade do Estado do Rio
Grande do Norte. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pela Diretoria de Informatização (DINF), sob orientação dos bibliotecários do SIB-UERN, para ser adaptado às necessidades da comunidade acadêmica UERN.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, Criador da vida. A toda minha família que sempre me ajuda e está comigo nas horas de alegria e tristeza, principalmente aos meus pais Maria do Socorro de Freitas e Paulo Paulino Bezerra.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais-PPGCN- por todo conhecimento transmitido ao longo desse tempo e no qual, tenho muita admiração e respeito, em especial, meu Orientador, Dr. Thiago Mielle B. F. Oliveira que esteve comigo desde o começo e sempre acreditou na minha capacidade. A minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Suely S. L. Castro que sempre esteve à disposição para me tirar dúvidas. A Ernani Dia da Silva Filho, por ceder o material modificador, fundamental para os resultados deste trabalho.

A todos os meus amigos, principalmente os laços de amizade construídos em sala de aula, assim como aos companheiros de laboratório Milton Alexandre e Kaio. Em fim a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A piscicultura está entre as atividades econômicas que mais crescem no Brasil e tem como principal característica a criação de peixes de forma controlada e planejada. Este crescimento se deve à constante e demasiada procura por organismos aquáticos para diversas finalidades, em especial para a alimentação humana. Para atender estas demandas, muitos piscicultores fazem uso de substâncias bioativas, principalmente de estrogênios sintéticos que estimulam o crescimento e/ou reprodução acentuada das espécies tratadas. Infelizmente, tais substâncias também podem ser nocivas para o metabolismo destas e de outras espécies consumidoras, que se encontra em outros níveis da cadeia alimentar, mesmo estando em baixas concentrações, mostrando a necessidade de métodos analíticos que auxiliem no controle de qualidade dos diferentes insumos oriundos do sistema produtivo. Dessa forma, o presente estudo teve como principal objetivo desenvolver um sensor eletroquímico para a eletroanálise do Estrogênio Dienestrol (DNL), utilizando um eletrodo de pasta de carbono (EPC) modificado com nanopartículas de prata, proporcionando novas alternativas para o controle de qualidade deste analito em matrizes da piscicultura. Os resultados mostraram que estes nanomateriais aumentam a área superficial e reduzem a resistência de transferência de carga do sensor de trabalho, definido como (Ag-NPs)|EPC. Em meio ácido (solução tampão BR com pH = 2), o DNL sofre processo de oxidação irreversível sobre (Ag-NPs)|EPC, com cinética eletródica moderadamente lenta e processo de transporte de massa controlado por adsorção de produtos na superfície do eletrodo. O processo foi associado com a oxidação de grupos fenólicos existentes na estrutura do estrogênio. Utilizando voltametria de onda quadrada sob condições otimizadas (frequência de 75 Hz, amplitude 30 mV e incremento de 2 mV), foram construídas curvas analíticas para o DNL, no qual obteve-se valores de limites de detecção e quantificação equivalentes a $4,37 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $9,08 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, além de precisão e exatidão aceitáveis para quantificar baixos níveis de concentração do estrogênio. As figuras de mérito comprovam a viabilidade do método eletroanalítico então desenvolvido para a eletroanálise de DNL em amostras complexas.

Palavras chaves: Aquicultura, estrogênios sintéticos, z,z-dienestrol, sensores eletroquímicos, determinação eletroanalítica.

ABSTRACT

Fish farming is among the fastest growing economic activities in Brazil and its main feature is the controlled and planned fish farming. This growth is due to the constant and excessive demand for aquatic organisms for various purposes, especially for human consumption. To meet these demands, many fish farmers make use of bioactive substances, especially synthetic estrogens that stimulate the growth and / or marked reproduction of treated species. Unfortunately, these substances can also be harmful to the metabolism of these and other consuming species, which is found in other levels of the food chain, even at low concentrations, showing the need for analytical methods that help in the quality control of different inputs. Of the productive system. Thus, the present study aimed to develop an electrochemical sensor for Dienestrol Estrogen Electroanalysis (DNL) using a silver nanoparticle modified carbon paste electrode (EPC), providing new alternatives for the quality control of this analyte. In fish breeding stock. The results showed that these nanomaterials increase the surface area and reduce the load transfer resistance of the working sensor, defined as (Ag-NPs) | EPC. In acid medium (BR buffer solution with pH = 2), DNL undergoes irreversible oxidation process over (Ag-NPs) | EPC, with moderately slow electrode kinetics and mass transport process controlled by adsorption of products on the electrode surface. The process was associated with the oxidation of phenolic groups in the estrogen structure. Using square wave voltammetry under optimized conditions (75 Hz frequency, 30 mV amplitude and 2 mV increment), analytical curves were constructed for the DNL, which obtained detection and quantification limit values equivalent to $4.37 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ and $9.08 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, respectively, and acceptable accuracy and precision to quantify low estrogen concentration levels. The merit figures prove the viability of the electroanalytical method then developed for DNL electroanalysis in complex samples.

Keywords: Aquaculture, synthetic estrogens, z, z-dienestrol, electrochemical sensors, electroanalytical determination.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(Ag-NPs)_{TH}|EPC - Eletrodo Pasta de Carbono Modificado com Nanopartículas de Prata com Tratamento Hidrotérmico

BR- Britton-Robinson

DNL – Dienestrol

DP - Desvio-Padrão

DPR –Desvio-Padrão Relativo

Ep – Potenciais de Pico

EPC- Eletrodo Pasta de Carbono

EQMs- Eletrodos Quimicamente Modificados

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

Ip – Corrente de Pico

LDs – Limites de Detecção

LQ - Limites de Quantificação

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

VC – Voltametria Cíclica

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de alguns estrogênios sintéticos utilizados na piscicultura	12
Figura 2: Estrutura química do estrogênio Z,Z Dienestrol.....	19
Figura 3 - Representação esquemática da célula eletroquímica.....	25
Figura 4: (A) Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtida para as nanopartículas de prata obtidas após tratamento hidrotérmico. (B) Magnificação da estrutura das nanopartículas.....	29
Figura 5: Difratoograma de raios-X obtidos para as nanopartículas de prata.....	30
Figura 6: Voltamogramas cíclicos registrados a 50 mV s^{-1} , antes e após as modificações do sensor de trabalho com as nanopartículas de prata, em meio de NaOH $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$	31
Figura 7: Voltamograma cíclico obtido para o dienestrol ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs) _{TH} EPC, em meio eletrolítico de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	32
Figura 8: Proposição mecanística para a eletrooxidação do dienestrol.....	33
Figura 9: Relação entre pH com as correntes e potenciais de pico registrados para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs) _{TH} EPC.....	34
Figura 10: Valores de corrente de pico registrados para a oxidação de DNL($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs) _{TH} EPC, usando voltametria cíclica a 50 mV s^{-1}	35
Figura 11: Relação da velocidade de varredura com as correntes e potenciais de pico obtida para a oxidação de DNL($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs) _{TH} EPC, em meio de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2).	36
Figura 12: Relação da frequência de aplicação dos pulsos da voltametria de onda quadrada (a = 50 mV e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$) com as correntes de pico obtidas para a oxidação de DNL ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs) _{TH} EPC, em meio de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2).....	37

Figura 13: Relação da amplitude dos pulsos de potencial da voltametria de onda quadrada ($f = 75\text{Hz}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$) com as correntes de pico obtidas para a oxidação de DNL ($1,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, em meio de solução tampão Britton-Robinson ($\text{pH} = 2$)..... 38

Figura 14: Relação do incrementode potencial da voltametria de onda quadrada ($f = 75\text{ Hz}$ e $a = 15\text{ mV}$) com as correntes de pico obtidas para a oxidação de DNL ($1,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, em meio de solução tampão Britton-Robinson ($\text{pH} = 2$).. 39

Figura 15: Voltamogramas de onda quadrada do DNL ($1,00 \times 10^{-7}$ a $2,00 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$) registrados para a sua oxidação sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC em meio de solução-tampão Britton-Robinson ($\text{pH} = 2,0$), aplicando-se $f = 75\text{ Hz}$, $a = 30\text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$ 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias utilizadas no controle da população de peixes em criadouros...	16
Tabela 2: Métodos cromatográficos utilizados para a análise de hormônios em matrizes ambientais e biológicas.....	20
Tabela 3: Estrutura e aplicação de eletrodos quimicamente modificados com diferentes nanomateriais.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. GERAL:	14
2.2. ESPECÍFICOS:	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. PISCICULTURA	15
3.2. ESTROGÊNIOS UTILIZADOS NA PISCICULTURA	15
3.3. Z,Z-DIENESTROL	19
3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS	20
3.5. MÉTODOS ELETROANALÍTICOS	21
3.6. SENSORES ELETROQUÍMICOS	22
4. METODOLOGIA	25
4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	25
4.2. EQUIPAMENTOS	25
4.3. DESENVOLVIMENTO DO SENSOR DE TRABALHO	26
4.4. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	26
4.5. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO ESTROGÊNIO	27
4.6. CURVA ANALÍTICA E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	29
5.2. MODIFICAÇÃO DO ELETRODO COM AS NANOPARTÍCULAS DE PRATA ...	30
5.3. TESTES DE ELETROATIVIDADE DO DIENESTROL	32
5.4. ESTUDO DE pH	33
5.5. ESTUDO DE VELOCIDADE DE VARREDURA	35
5.6. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ELETROANALÍTICOS	36
5.7. CURVA ANALÍTICA E FIGURAS DE MÉRITO	39
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

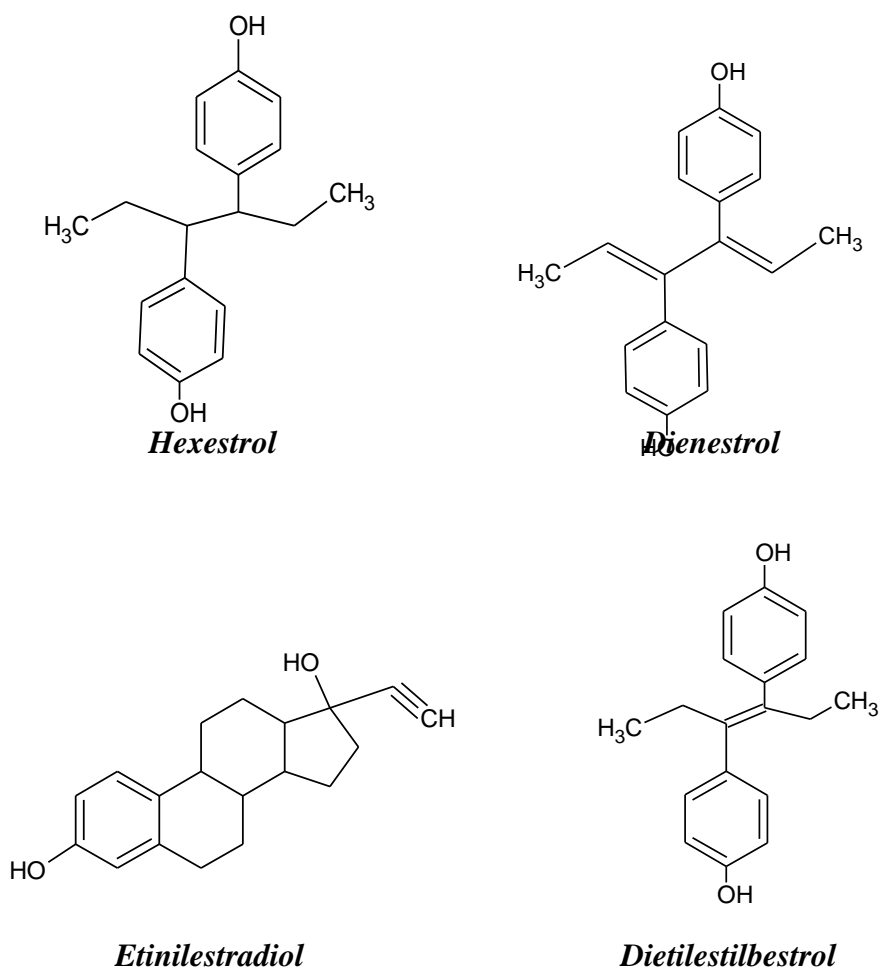
1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a aquicultura é uma atividade que vem ganhando destaques em todas as regiões e nos mais diversos tipos de cultivo: piscicultura, carcinicultura, ranicultura e malacocultura (QUEROL *et al.*, 2013). Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, a aquicultura brasileira em cativeiro produz, aproximadamente, 289.000 toneladas/ano (27% de toda a produção registrada no país), que se destina ao mercado de importação e exportação (IBAMA, 2007).

A piscicultura é o segmento da aquicultura destinado à criação de peixes, principalmente de água doce, em ambiente com condições propícias para o seu melhor desenvolvimento. Segundo Scorvo-Filho *et al.* (2010), a piscicultura brasileira é a segunda em produção sulamericana, apoiada especialmente nas cadeias de produção da tilapicultura. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013), o brasileiro consome em média 9,5 kg por habitante/ano de pescado. Devido ao seu alto valor nutritivo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um consumo mínimo de 12 kg de pescado/habitante/ano, embora a média mundial seja de 16 kg/habitante/ano (FAO, 2010). Neste contexto, estima-se que o Brasil tenha potencial para se transformar em um dos maiores produtores de pescado do mundo e o principal fornecedor para atender a previsão de consumo médio mundial de peixes, que será de 22 kg/habitante/ano até 2030.

A necessidade da criação de peixes em cativeiro se dá em virtude da baixa dos estoques naturais causada, sobretudo, pela pesca indiscriminada em mares, estuários e rios (SCORVO-FILHO *et al.*, 2010). Como a velocidade natural de crescimento e reprodução das espécies não acompanha as demandas de mercado, muitos aquicultores fazem uso de substâncias xenobióticas que apresentam caráter bioacumulador, biomagnificador e biotransformador, representando um sério risco à saúde daqueles que se encontram no topo da cadeia alimentar (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003). Uma série dessas substâncias pode desregular as funções endócrinas dos seres vivos, inclusive dos próprios seres humanos (OLIVEIRA, 2013; LIMA, 2012). Entre as substâncias xenobióticas destacam-se os estrogênios sintéticos, tais como *Hexestrol*, *Dienestrol*, *Etinilestradiol*, *Dietilestilbestrol* (Figura 1), entre outros, que são utilizados para induzir o crescimento acentuado das populações nos diferentes cultivos, afetando o metabolismo das espécies pela mimetização das funções desencadeadas pelos hormônios naturais (LIMA, 2012; OLIVEIRA, 2013).

Figura 1: Estrutura química de alguns estrogênios sintéticos utilizados na piscicultura



Fonte: Aatoria própria, 2019.

Com isso, surge a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos eficientes que auxiliem no controle de qualidade dos diferentes insumos oriundos da cadeia produtiva. De acordo com Lima (2012), em muitas matrizes ambientais, o monitoramento desses compostos é realizado através de métodos espectroscópicos e/ou cromatográficos convencionais, que apresentam limitações quanto à susceptibilidade a interferentes, produção de resíduos tóxicos, custo e tempo de análise, o que dificulta a implementação dos procedimentos para análises em larga escala nos laboratórios de controle de qualidade e demais órgãos especializados.

Nesta ótica, o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos surge como uma potencial alternativa por apresentarem possibilidade de miniaturização, simplicidade

operacional e potencialidade para aplicações *in loco* e *in vivo*. Nestes procedimentos, as medidas são realizadas com “sensores eletroquímicos”, ou seja, dispositivos analíticos são capazes de converter a resposta química observada para uma reação redox ocorrida na interface eletrodo/solução em um sinal elétrico mensurável (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003; OLIVEIRA, 2013). Os sensores eletroquímicos também têm ganhado grande aceitação científica por propiciarem elevada sensibilidade, precisão e seletividade das medidas, mesmo na presença de potenciais interferentes e em amostras de alta complexidade analítica (ALLERSTON; REES, 2018).

Com o avanço nas pesquisas com materiais nano estruturados, dispositivos ainda mais acurados e robustos estão sendo propostos, com melhorias significativas nas propriedades elétricas, mecânicas e térmicas (ZHOU *et al.*, 2014). As nanopartículas metálicas estão entre as mais investigadas por atribuir excelente atividade eletrocatalítica para o processo redox de muitas moléculas, melhoram os processos de transferência eletrônica e são facilmente sintetizadas e manipuladas (JING; REICHERT, 2017). Entretanto, o número de sensores propostos na literatura para a eletroanálise de estrogênios sintéticos, incluindo aqueles arquitetados com nanoestruturas, ainda é limitado, restringe-se a um pequeno número de xenobióticos e poucos mostram aplicabilidade para o controle de qualidade em produtos e insumos da aquicultura, justificando a motivação desse trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL:

Desenvolver um sensor eletroquímico para a eletroanálise do estrogênio *Z,Z*-Dienestrol (DNL), utilizando um material compósito de carbono e nanopartículas de prata (Ag-NPs), proporcionando novas alternativas para o diagnóstico deste analito em matrizes da piscicultura.

2.2. ESPECÍFICOS:

- Obter e caracterizar nanopartículas de prata por diferentes rotas de síntese;
- Estudar a eletroatividade, propriedades termodinâmicas, cinética e mecanismo de reação do DNL sobre o sensor de trabalho;
- Avaliar e otimizar parâmetros operacionais para a eletroanálise do estrogênio;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. PISCICULTURA

A aquicultura consiste na criação de organismos aquáticos em condições controladas e constitui uma atividade economicamente rentável, desde que feita com base em projetos tecnicamente corretos (CYRINO *et al.*, 2012). De acordo com Rocha *et al.* (2013), a aquicultura é o maior negócio primário do mundo, sendo sua produção duas vezes maior que a produção de soja, sete vezes maior que a da carne de mamíferos e nove vezes maior que a do frango.

A piscicultura surgiu na China há cerca de 4 mil anos, onde também se desenvolveu o consórcio entre peixes e outros animais mamíferos, como búfalos e suínos. Sua principal característica é a criação de peixes de forma planejada e controlada. A produção de peixes na natureza se distingue da piscicultura porque nesta há o controle do crescimento e da reprodução, constituindo-se assim em uma atividade técnico-econômica (SOARES, 2003). A piscicultura é dividida em três tipos: (I) extensiva, na qual utiliza grandes reservatórios naturais ou artificiais, onde a densidade populacional de peixes é baixa e a sua alimentação e reprodução não são controladas; (III) semi-extensiva, na qual tem um controle maior da alimentação e da reprodução; e (II) intensiva, que utiliza tanques e reservatórios construídos para obter um máximo de peixes por unidade de área, através do controle da alimentação e reprodução (ROCHA *et al.*, 2013).

Independente da modalidade de cultivo, as principais espécies de peixes cultivadas na piscicultura brasileira são tilápia (*Oreochromis niloticus*), cuja produção alcançou 219 mil toneladas em 2015 (45,4% do total da produção nacional), e o tambaqui (*Colossomamacropomum*), um peixe nativo da região Amazônica, com produção equivalente a 135 mil toneladas (28,1% da produção brasileira) (BRASIL, 2015).

3.2. ESTROGÊNIOS UTILIZADOS NA PISCICULTURA

Com a crescente demanda das atividades aquícolas, em especial da piscicultura, o uso de substâncias com bioatividade hormonal vem se tornando uma prática comum e que tem como objetivo o aumento da produtividade. Agrotóxicos, hormônios sintéticos e antibióticos são exemplos dessas substâncias que, por sua vez, vêm sendo utilizadas de forma indiscriminada no manejo de muitos cultivos. Esses compostos afetam o sistema endócrino dos organismos tratados e demais espécies consumidoras incluindo os seres humanos (WAISSMANN, 2002; FALONE, 2007). Os disruptores endócrinos agem por

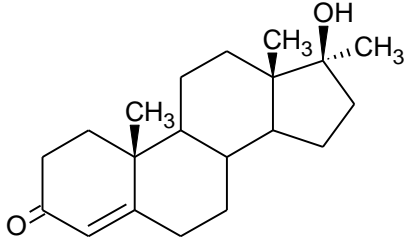
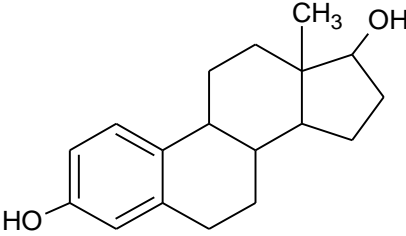
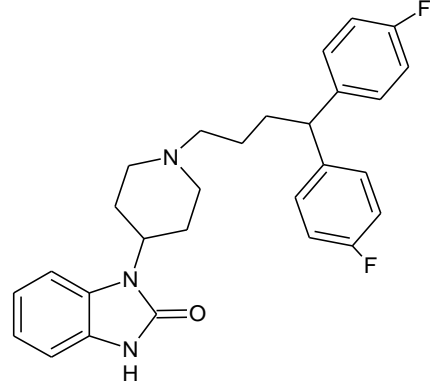
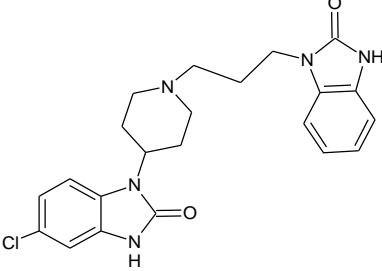
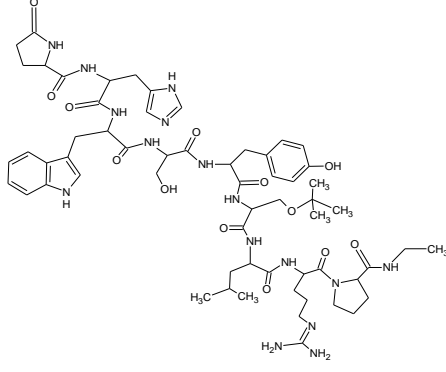
mecanismos fisiológicos pelos quais substituem os hormônios do nosso corpo, aumentando ou diminuindo a quantidade original de hormônios (SANTAMARTA, 2001).

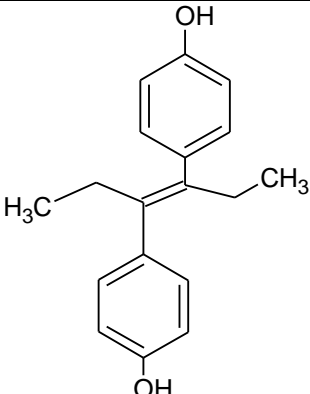
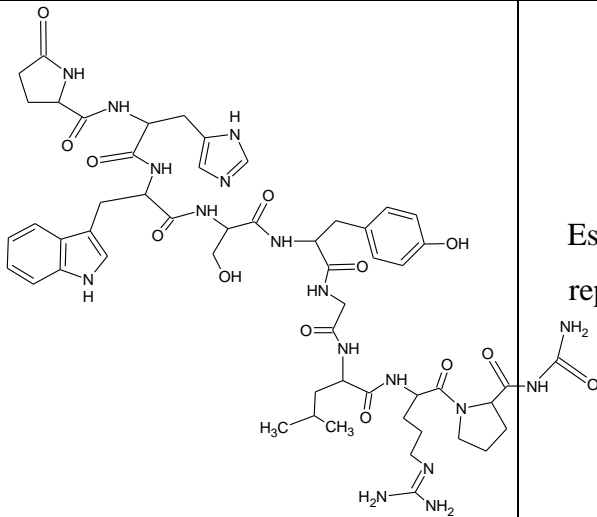
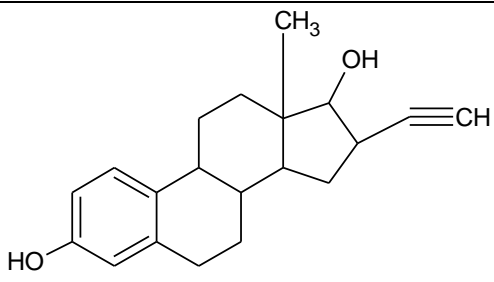
São compostos exógenos que debilitam a saúde de organismo e progênios secundários, interferindo na homeostase e no processo de desenvolvimento (GUIMARÃES, 2008). Essas substâncias apresentam risco à saúde humana e estão relacionados a uma série de desordens metabólicas, incluindo o desenvolvimento de carcinomas (LIMA, 2012; OLIVEIRA 2013; EDWARDS 2015). Recentemente, muitos efeitos causados pelos desreguladores endócrinos têm sido relatados, incluindo anomalias no sistema reprodutivo de animais (peixes, répteis e pássaros); indução da síntese de vitelogenina (VTG) no plasma de peixes e efeitos na saúde de humanos, tais como, redução na produção de esperma e aumento da incidência de alguns tipos de câncer (BILA; DEZOTTI, 2017).

Estudos realizados por Hartmann *et al.* (1998) confirmam a presença de hormônios sexuais (17β -estradiol, estrona, testosterona e progesterona) em carnes (bovinos, suínos, aves e peixes), leite e derivados, ovos e em 17 diferentes espécies de plantas (gramíneas e leguminosas) cultivadas no Iran, sendo que a principal justificativa apontada pelos autores foi o uso indiscriminado desses esteróides na agropecuária local. No ramo da aquicultura, Panter, Thompson e Sumpter (1998) reportaram efeitos adversos desses compostos em peixes machos da espécie *Pimephalespromelas*, a exemplo da inibição testicular e síntese de vitelogenina (VTG) quando expostos à concentrações baixas de 17β -estradiol (10, 32, 100, 320 e 1000 ng/L) e estrona (9,9, 31,8, 99,3, 318, 993 ng/L). Hutchinson (2002) e Schmid *et al.* (2002) também observaram a síntese de VTG durante a exposição de crustáceos *Tisbebatlagliai* e peixes *Pimephalespromelas* a substâncias com atividade estrogênica (dietilestilbestrol, 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e 20-hidroxiectodossona). Os peixes estão entre os grupos de organismos mais estudados para testes de substâncias com atividade estrogênica. A Tabela 1 mostra algumas substâncias utilizadas no controle da população de peixes em criadouros, bem como suas funções nas espécies tratadas.

Tabela 1: Substâncias utilizadas no controle da população de peixes em criadouros.

Substância	Estrutura Química	Função	Referência
------------	-------------------	--------	------------

<p>17α- metiltestosterona</p>	 <p>The structure shows a steroid nucleus with a ketone group at C3, a double bond between C4 and C5, a methyl group at C13, and two methyl groups at C17 (one wedged, one dashed), and a hydroxyl group at C17.</p>	<p>Reversão sexual</p>	<p>FALONE, 2007.</p>
<p>17β-estradiol (E2)</p>	 <p>The structure shows a steroid nucleus with a hydroxyl group at C3, a double bond between C4 and C5, a methyl group at C13, and a hydroxyl group at C17.</p>	<p>Reversão sexual</p>	<p>HOGA, 2016.</p>
<p>Pimozida</p>	 <p>The structure features a piperazine ring connected to an indazole ring system. The piperazine ring is further substituted with a 4-fluorophenyl group and a 4-fluorophenylpropyl chain.</p>	<p>Estimular a reprodução</p>	<p>ABRUNHOSA, 2011.</p>
<p>Domperidona</p>	 <p>The structure consists of a piperazine ring attached to a 4-chloro-1H-benzimidazole ring system and a 1H-benzimidazole ring system.</p>	<p>Estimular a reprodução</p>	<p>ABRUNHOSA, 2011.</p>
<p>Buserelina</p>	 <p>The structure is a complex peptide derivative with multiple amide bonds, a hydroxyl group, a methyl group, and a guanidino group.</p>	<p>Estimular a reprodução</p>	<p>PAULINO <i>et al.</i>, 2011.</p>

Dietilestilbestrol		Estimular a reprodução	BILA e DEZOTTI, 2007.
Gonadorelina		Estimular a reprodução	MUNIZ, CATANHO e SANTOS 2008; FELIZARDO <i>et al.</i> , 2012.
17 α -Etilestradiol		Estimular a reprodução	HOGA, 2016.

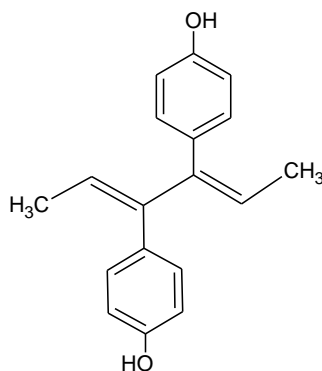
Fonte: Autoria própria, 2019.

De acordo com a Tabela 1, os compostos utilizados nos criadouros apresentam como função promover o controle de população ou para estimular a reprodução das espécies. Pesticidas, hormônios sintéticos e antibióticos, vem sendo utilizado de forma indiscriminada em muitos cultivos (ISMAIL, WEE e ARIS, 2017). Muitas destas substâncias também são persistentes no meio ambiente, acumulam-se no solo e no sedimento de rios. Acumulam-se ao longo da cadeia trófica, representando um sério risco à saúde dos seres humanos que se encontram no topo da cadeia alimentar (MEYER *et al*, 1999).

3.3. Z,Z-DIENESTROL

O Z,Z-Dienestrol (Figura 2) é um estrogênio sintético não-esteroidal, pertencente ao grupo dos receptores β -agonistas (substâncias que ativam receptores específicos da membrana das fibras musculares e dos adipócitos, modificando o metabolismo celular dos tecidos muscular e adiposo), estando entre os mais utilizados para fins anabolizantes na aquicultura. Trata-se de um composto químico da classe dos estilbenos, de massa molar igual a $266,34 \text{ g mol}^{-1}$, e que apresenta baixa solubilidade em água e ligeira solubilidade em etanol (GAO *et al.*, 2015). Uma vez administrado, o DNL difunde-se passivamente em direção às células alvo de tecidos complexos, interagindo mimeticamente com um receptor de proteínas do sistema endócrino dos seres vivos, afetando o equilíbrio da transcrição genética na síntese proteica após a ligação ao DNA. A combinação de um estrogênio com uma progestina também suprime o sistema hipotálamo-hipofisário, diminuindo a secreção de hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), isso ocorre porque, no organismo, os estrogênios aumentam a síntese hepática da globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG), globulina de ligação à tireoide (TBG), entre outras proteínas séricas, suprimindo a ação do hormônio folículo-estimulante (FSH) da hipófise anterior. (HONG *et al.*, 2015).

Figura 2: Estrutura química do estrogênio Z,Z Dienestrol



Fonte: Aatoria própria, 2019.

O DNL é utilizado como aditivo em rações comerciais, sendo que sua presença na biomassa das espécies acarreta na contaminação direta dos seres que venham a se alimentar das mesmas, o que reforça a importância no controle de qualidade desse estrogênio nessas culturas (HE *et al.*, 2016).

3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para o monitoramento de hormônios naturais e sintéticos em matrizes ambientais. A Tabela 2 sumariza algumas metodologias propostas, utilizando desde sistemas cromatográficos tradicionais aos modelos hifenados. Apesar de serem bastante utilizados, tais métodos apresentam algumas desvantagens inerentes à análise, como elevado tempo de análise, custo elevado, requer profissionais altamente experientes e qualificados para a operação dos equipamentos, etapas prévias de *clean up*, entre outros (SOUZA, MACHADO, AVACA, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Tais fatos justificam a necessidade de mais pesquisas voltadas ao desenvolvimento de métodos alternativos para a análise e controle de qualidade de estrogênios em matrizes potencialmente impactadas.

Tabela 2: Métodos cromatográficos utilizados para a análise de hormônios em matrizes ambientais e biológicas.

TÉCNICA	HORMÔNIOS	MATRIZ INVESTIGADA	REFERÊNCIA
LC/MS/MS	Estrona e Estriol.	Efluentes	Koh <i>et al.</i> (2007)
LC/MS/MS	Estriol e estrona e alguns subprodutos estrona	Sedimento de rios	Matejicek <i>et al.</i> (2007)
LC/ESI-MS	Estriol e estrona entre outros estrogênios	Água de rio	Matejicek e Kuban (2008)
LC/UV	Estriol, 17 β -estradiol e estrona	Água de rios não tratadas	Wang <i>et al.</i> (2008)
GC/MS	Estrona	Plasma sanguíneo de camundongos	Chen <i>et al.</i> (2009)
GC/MS/MS GC/MS LC/MS/MS	Estrona e 17 β -estradiol	Efluentes de estação de tratamento	Grover <i>et al.</i> (2009)
GC/MS	Estrona, 17 β -estradiol e estriol entre outros desreguladores endócrinos	Lodo de esgotos proveniente de estação de tratamento	Nie <i>et al.</i> (2009)

LC/MS	Estrona e estriol	Esgoto bruto, tratado e em águaderio	Kumar <i>et al.</i> (2009)
LC/MS	Estrona, 17 β -estradiol e estriol	Leite	Yan <i>et al.</i> (2009)

*CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; LC/UV: cromatografia líquida com detecção por radiação ultravioleta; LC/MS: cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas; LC/MS/MS: cromatografia líquida acoplada a dois espectrômetros de massas sequências; GC/MS: cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas; GC/MS/MS: cromatografia gasosa acoplada a dois espectrômetros de massas sequências.

Fonte: Autoria própria, 2019.

3.5. MÉTODOS ELETROANALÍTICOS

Os métodos eletroanalíticos têm como base as propriedades elétricas mensuráveis (corrente, potencial, carga, condutividade ou resistência) de um analito em solução quando este sofre processo redox em uma cela eletroquímica. Estudos de processos de oxidação e redução, adsorção em superfícies, ganho de massa, cinética e mecanismo de transferência de elétrons estão entre as várias informações que podem ser obtidas com estes métodos. Pela vasta aplicação, os mesmos vêm ganhando força na utilização em diferentes áreas como medicina, bioquímica, ciências ambientais, engenharias, agropecuária, entre outras (GIL; AMORIM; MONTENEGRO; ARAÚJO, 2018).

A voltametria cíclica (VC) está entre as técnicas mais relevantes e amplamente empregadas em estudos eletroanalíticos (AHMAD e ALGHAMDI, 2010). A mesma é utilizada para fornecer informações sobre a termodinâmica das reações, detecção de intermediários e reações paralelas, reversibilidade dos processos, cinética reacional, mecanismos de transporte de massa, entre outros (JOVANOVSKI, HOČEVAR e OGOREVC, 2017). A resposta de corrente (Amperes) em um eletrodo de trabalho é obtida a partir da aplicação de um potencial (Volts) na forma de uma onda triangular, onde é realizada uma varredura no sentido direto e, posteriormente, no sentido inverso. Assim, todos os processos de oxidação e redução podem ser observados em um único ciclo de potencial (BARD & FAULKNER, 2004). A CV é mais utilizada para verificar informações qualitativas da substância de interesse (SANTOS, 2013).

Do ponto de vista quantitativo, as voltametrias de pulso são mais adequadas por minimizarem os efeitos indesejáveis das correntes capacitivas, necessárias para reestabelecer o equilíbrio de cargas na dupla camada elétrica formada na interface eletrodo/solução (OSTERYOUNG e OSTERYOUNG, 1985). Dentre as voltametrias de pulso existentes, a voltametria de onda quadrada (VOQ), utiliza um modelo de aplicação

dos pulsos similar à voltametria de pulso diferencial, no entanto utiliza pulsos simétricos e simultâneos no sentido direto e reverso da varredura de potencial, conferindo no aumento da sensibilidade das medidas (SKOOG *et al.*, 1998). A utilidade desta técnica vem sendo atestada para a determinação de baixos níveis de fármacos, pesticidas, nutrientes, proteínas, nucleotídeos, entre várias outras substâncias de interesse biológico e ambiental (OSTERYOUNG e OSTERYOUNG, 1985; SOUZA *et al.*, 2004; USLU, OZKAN, 2011).

Lin e Li (2006) desenvolveram um método para detectar estrona, 17 β -estradiol e estriol em soro sanguíneo de humanos, utilizando VOQ e um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanoclusters de platina e nanotubos de carbono. A análise de estrógenos totais foi acompanhada pelo pico de oxidação registrado em +0,43 V (*vs.* SCE). Analisando cada estrogênio individualmente, obteve-se LD = 840 nmol L⁻¹ para estrona, LD = 620 nmol L⁻¹ para estriol e LD = 180 nmol L⁻¹ para 17 β -estradiol.

Estudos realizados por Fernández *et al* (2009) demonstram a adsorção da progesterona em carbono vítreo, utilizando VOQ como técnica assistiva, o qual o LD obtido foi de 3 \times 10⁻⁵ mol L⁻¹.

Morais *et al.* (2011) verificaram o comportamento eletroquímico do esteróide progesterona, o qual utilizou-se a VC e um eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de cobalto, possibilitando a detecção de progesterona (LD = 1,4 \times 10⁻⁷ mol L⁻¹) em fluidos biológicos.

A utilização de métodos eletroanalíticos apresenta uma série de vantagens em relação aos tradicionais, dentre as quais se podem citar a simplicidade, rapidez, baixo custo de sua instrumentação, possibilidade de miniaturização, realização das medidas diretamente na amostra e, em alguns casos, sem necessidade de etapas prévias de tratamento. Também possibilita a análise de materiais coloridos, na presença de partículas sólidas e possibilidade de medidas *in loco* (OLIVEIRA *et. al.*, 2015).

3.6. SENSORES ELETROQUÍMICOS

Devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem atraído um número cada vez maior de pesquisadores por possibilitarem análises diretas nessas matrizes, preservando a sensibilidade, seletividade, robustez e precisão exigida para o método (OLIVEIRA, 2015).

A versatilidade das técnicas eletroquímicas está, em grande parte, na possibilidade de controlar a intensidade na qual as reações redox ocorrem, modificando/controlando a natureza da interface eletrodo-solução, resultando nos chamados eletrodos quimicamente modificados - EQMs (OLIVEIRA, 2018).

Alguns estudos mostram que a utilização de nanomateriais melhora expressivamente a resposta eletroquímica dos sensores. A Tabela 3 apresenta exemplos de EQMs estruturados com nanomateriais e suas respectivas aplicações. Como pode ser observado, há diferentes nanomateriais que podem ser utilizados no desenvolvimento do sensor (OLIVEIRA e MORAIS, 2018), mas a escolha do modificador e do método de imobilização varia de acordo com as especificidades do suporte eletródico, natureza do analito e infraestrutura disponível. Dentre os métodos de imobilização existentes estão: a adsorção que consiste na interação física do modificador na superfície do eletrodo; por meio de ligação covalente, no qual o modificador é fixado na superfície eletródica por ligação covalente, e a imobilização por oclusão, que é comumente usada na obtenção de pastas de carbono modificadas, nas quais há a mistura de grafite em pó, agente modificador e um aglutinante podendo ser parafina ou óleo mineral (PEREIRA, 2002; VALLE, 2011; WONG, 2014).

Tabela 3: Estrutura e aplicação de eletrodos quimicamente modificados com diferentes nanomateriais.

Suporte eletródico	Nanomaterial modificador	Aplicação	Referência
Carbono vítreo	Fulereo-C ₆₀	Soro sanguíneo e urina humana	(GOYAL, GUPTA e BACHHETI, 2007)
Óxido de grafeno	porfirinas metalizadas	Águas de rio	(MORAES <i>et al.</i> , 2014)
Carbono vítreo	nanopartículas de ouro	Leite	(ZANG, <i>et al.</i> , 2014)
Carbono vítreo	nanomateriais carbonáceos	Soro sanguíneo e urina humana	(SERAFÍN, <i>et al.</i> , 2014)

Carbono vítreo	nanopartículas de antimônio	Águas naturais e fluidos biológicos	(CINCOTTO, 2016)
Pasta de carbono	nanopartículas Fe ₃ O ₄ e líquido iônico de BMI.PF ₆	Carne suína	(MOREIRA, MARANHÃO e SPINELLI, 2017)
Carbon Black	nanopartícula de prata	Águas	(RAYMUNDO-PEREIRA, <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Adaptado de Lima Filho, 2019.

Os sensores à base de carbono e nanopartículas metálicas surgem como superfícies promissoras na eletroanálise de hormônios. Tais sensores apresentam inúmeras funcionalidades como alta resistência à tração e alta condutividade elétrica e térmica (GOULART, *et al.*, 2017).

4. METODOLOGIA

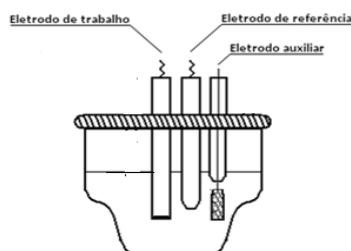
4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o desenvolvimento da pesquisa, todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica e suas respectivas soluções preparadas com água ultrapura ($\rho \geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$), a partir da dissolução de quantidades adequadas do reagente, sem prévia purificação. A solução-estoque de DNL ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi preparada com padrão de alta pureza (99,5%) da Sigma-Aldrich, utilizando álcool etílico absoluto (Synth) como solvente. O ácido clorídrico e hidróxido de sódio, utilizados no ajuste de pH das soluções eletrolíticas; e os ácidos bórico (99,5 %), fosfórico (85,0 %) e acético (99,7 %), utilizados na preparação da solução tampão *Britton-Robinson*, empregada como eletrólito suporte, foram adquiridos da Vetec. Os demais reagentes utilizados para a síntese das nanopartículas de prata (Ag-NPs) foram: nitrato de prata, nitrato de ferro, nitrato de cobalto e quitosana, adquiridos da Sigma-Aldrich; além de hidróxido de sódio, glutaraldeído e ácido cítrico, obtidos da Synth.

4.2. EQUIPAMENTOS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato μ -Autolab III, fabricado pela Metrohm – Pensalab. O sistema foi conectado a uma célula eletroquímica convencional (10,0 mL) composta por três eletrodos: (i) eletrodo pasta de carbono (EPC), eletrodo pasta de carbono modificado com Ag-NPs, definido como Ag-NPs|EPC ($5,0 \text{ mm}^2$) e eletrodo pasta de carbono modificado com Ag-NPs após tratamento hidrotérmico (Ag-NPs)_{TH}|EPC usados como sensores de trabalho, (ii) eletrodo auxiliar de platina ($10,0 \text{ mm}^2$) e (iii) eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl/ Cl^- saturado) como referência (Figura 3)

Figura 3 - Representação esquemática da célula eletroquímica.



Fonte: Adaptado de Paiva, 2017.

O êxito na modificação de EPC com Ag-NPs foi monitorado por voltametria cíclica (VC), microscopia eletrônica de varredura (MEV; FEG-SEM, modelo Zeiss Supra 35) e difração de raios-X (DRX; Minifex II, Rigaku). Os dados obtidos por VC auxiliam no entendimento do perfil voltamétrico do sensor de trabalho, antes e após a etapa de modificação; as informações adquiridas por MEV foram utilizadas para estudos de morfologia da superfície de trabalho; enquanto que os dados de DRX fornecem informações sobre a composição do material de trabalho. Para o tratamento hidrotérmico das Ag-NPs, foi utilizado um forno tubular, da marca Jung, mantido sob atmosfera de $H_{2(g)}$ em temperatura controlada.

Quando se fez necessário o ajuste de pH do eletrólito suporte, o procedimento foi acompanhado por potenciometria direta, utilizando um medidor multiparamétrico Orion 5Star, da ThermoElectron Corporation, acoplado a um eletrodo H^+ /íon-seletivo. Para o preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura adquirida de um sistema PurelabMili-Q, fabricado pela Analítica.

4.3. DESENVOLVIMENTO DO SENSOR DE TRABALHO

Inicialmente, para a construção do eletrodo de trabalho, foram preparadas pastas de carbono, a partir da mistura entre grafite e óleo mineral -Nujol[®] (80:20%, m/m). No caso de EPC, a pasta de carbono foi embutida diretamente em um tubo de teflon, com contato elétrico estabelecido por um pistão de aço inoxidável. Para o desenvolvimento de Ag-NPs|ECC, foi produzido um novo compósito entre a pasta de carbono e diferentes proporções de Ag-NPs (0,5 %), antes e após tratamento hidrotérmico feito em atmosfera de $H_{2(g)}$ por 30 min, na temperatura de 350°C. Sempre que necessário, a superfície do eletrodo de trabalho era polida mecanicamente em papel celulose de baixa rugosidade, a fim de renovar a superfície ativa do sensor.

4.4. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A síntese de Ag-NPs seguiu o método proposto por Soares Jr. (2013), usando a técnica de coprecipitação dos sais de prata, ferro e cobalto em template polimérico de quitosana. A solução de quitosana foi preparada dissolvendo-se 0,5 g do biopolímero em 25 mL de ácido cítrico (20%). Em seguida, dissolveu-se 0,62 g de $Fe(NO_3)_3$, 0,22 g de $Co(NO_3)_2$ e 1,16 g de $AgNO_3$ na mistura polimérica. A solução resultante foi gotejada lentamente em solução mista contendo 18 g de NaOH e 2,5 mL de glutaraldeído, dissolvidos em 90 mL de água aquecida a 70 °C. A mistura foi mantida sob agitação por

24 h e, posteriormente, o precipitado foi lavado com água até que o pH permanecesse neutro. Um tratamento térmico ao ar, na temperatura de 300 °C foi necessário para a calcinação da quitosana. Para a redução térmica das amostras, o processo foi conduzido em atmosfera de H_{2(g)}, mantendo um fluxo de gás de 50 sccm por 30 min, utilizando um forno tubular ajustado a 350 °C. O material obtido após tratamento hidrotérmico foi definido como (Ag-NPs)_{TH}.

4.5. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DO ESTROGÊNIO

O estudo do comportamento eletroquímico do DNL ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) sobre o sensor de trabalho foi investigado na presença e ausência das nanopartículas metálicas, antes e após o tratamento hidrotérmico, utilizando-se diferentes soluções eletrolíticas (HCl, H₂SO₄, tampão fosfato, tampão acetato e tampão Britton-Robinson) ajustadas a pH = 2,0. Conhecendo o melhor eletrólito de trabalho, prosseguiu-se com a otimização do pH do meio (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0), na perspectiva de compreender o caráter próton-dependente da molécula em estudo. Utilizando-se as melhores condições experimentais, o perfil voltamétrico do DNL foi observado por VC em diferentes velocidades de varredura (v ; 25, 50, 75, 100, 125; 150; 175 e 200 mVs⁻¹), de forma que os dados obtidos foram usados nas discussões relacionadas com a reversibilidade, caráter adsorptivo e cinética eletródica, utilizando os critérios de diagnósticos da técnica.

4.6. CURVA ANALÍTICA E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A quantificação do DNL foi feita por VOQ, após otimizar os parâmetros que afetam a sensibilidade analítica desta técnica: frequência de aplicação dos pulsos de potencial (f ; 10 – 200 s⁻¹), amplitude dos pulsos (a ; 5 – 60 mV) e incremento de potencial (ΔE_s ; 1 – 7 mV). A curva analítica foi construída a partir da correlação das sucessivas adições do DNL ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com os respectivos valores de I_p , fazendo uma varredura de potencial entre 0,0 e 1,2 V, em meio de solução-tampão Britton-Robinson ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) ajustada a pH 2,0. Os dados da curva de regressão linear, obtidos pela média aritmética (\bar{x}) entre três medidas realizadas para cada concentração, foram utilizados para os cálculos das figuras de mérito.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados pela relação entre o desvio-padrão (DP) dos interceptos (a) e a média das inclinações (\bar{b}) das curvas analíticas, conforme indicado nas seguintes equações:

$$LD = 3 \times \frac{DP_a}{\bar{b}} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{DP_a}{\bar{b}} \quad (2)$$

A precisão foi analisada com base no desvio padrão relativa (DPR %) das correntes de pico das medidas ($n = 3$) a uma mesma concentração do analito, conforme indicada na Equação 03:

$$DPR \% = \frac{DP\bar{x}Ip}{\bar{x}Ip} \times 100\% \quad (3)$$

Onde, $DP\bar{x}Ip$ é o desvio padrão da média das correntes de pico e $\bar{x}Ip$ é a média das correntes de pico.

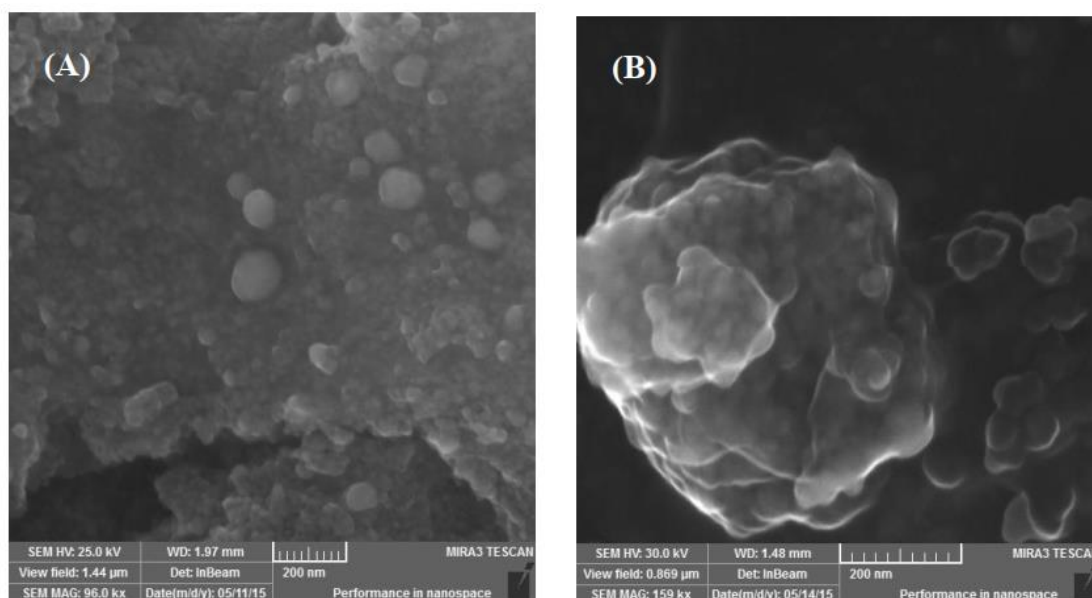
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Para o desenvolvimento do sensor de trabalho, foi utilizado um suporte eletródico à base de um material compósito de carbono formado de grafite e óleo mineral. Este material apresenta uma elevada área superficial e baixa resistência de transferência de carga, oferecendo praticidade para a construção do dispositivo e para a modificação da superfície com novos (nano)materiais funcionais. Neste sentido, considerando o elevado potencial eletroquímico necessário para a oxidação dos estrogênios sintéticos, optou-se por trabalhar com Ag-NPs como agente modificador. As nanopartículas metálicas possuem efeito eletrocatalítico e reduzem a passivação da superfície por produtos da reação redox de interesse, como aqueles observados com a oxidação do DNL (OLIVEIRA e MORAIS, 2018).

As características morfológicas de Ag-NPs foram obtidas por MEV e estão sumarizadas na Figura 4. As micrografias revelaram o êxito na obtenção de nanopartículas com formas esféricas e tamanhos relativamente uniformes (Figura 4A).

Figura 4:(A) Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtida para as nanopartículas de prata obtidas após tratamento hidrotérmico. (B) Magnificação da estrutura das nanopartículas.



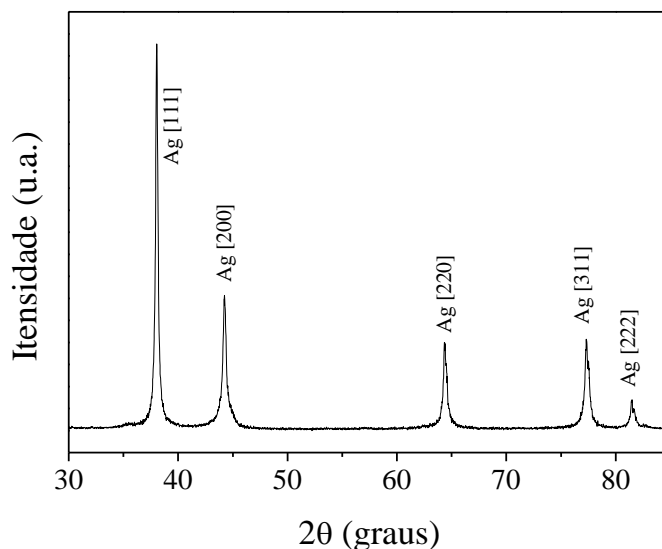
Fonte: Autoria própria, 2019

Observando as imagens em um maior nível de magnificação (Figura 4B), constatou-se ainda que as Ag-NPs possuíam tamanhos praticamente uniformes, mas com tendência a formar agregado sem virtude da elevada energia superficial desses

nanomateriais. Normalmente, essa característica também dificulta a associação das nanopartículas com outros materiais devido à redução da área de contato. Ocasionalmente, esse fator pode subtrair as características desejadas para um material híbrido com potencial utilização em métodos eletroanalíticos. Todavia, ao introduzir as Ag-NPs na configuração do eletrodo de trabalho, observaram-se melhorias substanciais no desempenho do dispositivo, conforme será demonstrado adiante. Vale ressaltar ainda que esses resultados se repetiram usando Ag-NPs e (Ag-NPs)_{TH}.

Dados de DRX foram analisados com o intuito de averiguar a composição e cristalinidade das nanopartículas (Figura 5). Os padrões cristalográficos apontam para o predomínio de uma estrutura cúbica de face-centrada (JCPDS n° 01-087-0719). Os picos de difração registrados nos ângulos 38,20°, 44,26°, 64,34°, 77, 27° e 81,69° podem ser atribuídos aos planos cristalográficos 111, 200, 220, 311 e 222, respectivamente. Os dados ainda mostram Ag⁰ como a principal fase cristalina e ausência de impurezas metálicas secundárias, oriundas do processo de síntese. Assim como observados nas análises de MEV, o conjunto de resultados obtido para a caracterização de Ag-NPs e (Ag-NPs)_{TH} por DRX também foi bastante similar.

Figura 5: Difratoograma de raios-X obtidos para as nanopartículas de prata.



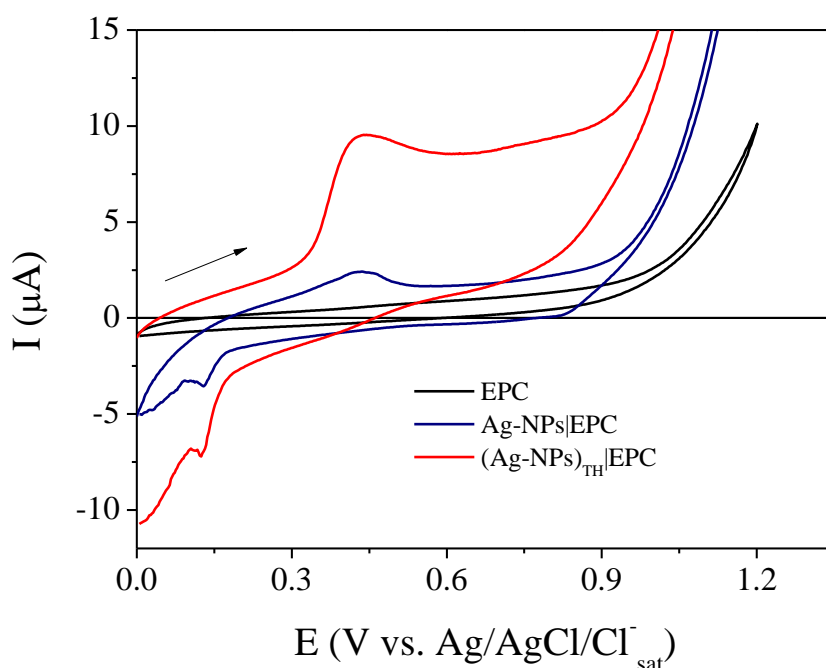
Fonte: Autoria própria, 2019.

5.2. MODIFICAÇÃO DO ELETRODO COM AS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Em relação à imobilização das nanopartículas sobre o Eletrodo Pasta de Carbono (EPC), o processo de modificação foi acompanhado por VC a 50 mV s⁻¹, em meio de

NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, para uma faixa de potencial compreendida entre 0,0 e 1,2 V. Conforme pode ser observado na Figura 6, o perfil voltamétrico observado para EPC não-modificado é bem distinto daqueles registrados na presença das nanopartículas de prata. Após o processo de modificação, pode-se identificar um par redox bem definido, com picos de oxidação e redução registrados em 0,43 V e 0,13 V, respectivamente, que foram associados à eletroconversão do sistema Ag/AgO.

Figura 6: Voltamogramas cíclicos registrados a 50 mV s^{-1} , antes e após as modificações do sensor de trabalho com as nanopartículas de prata, em meio de NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L



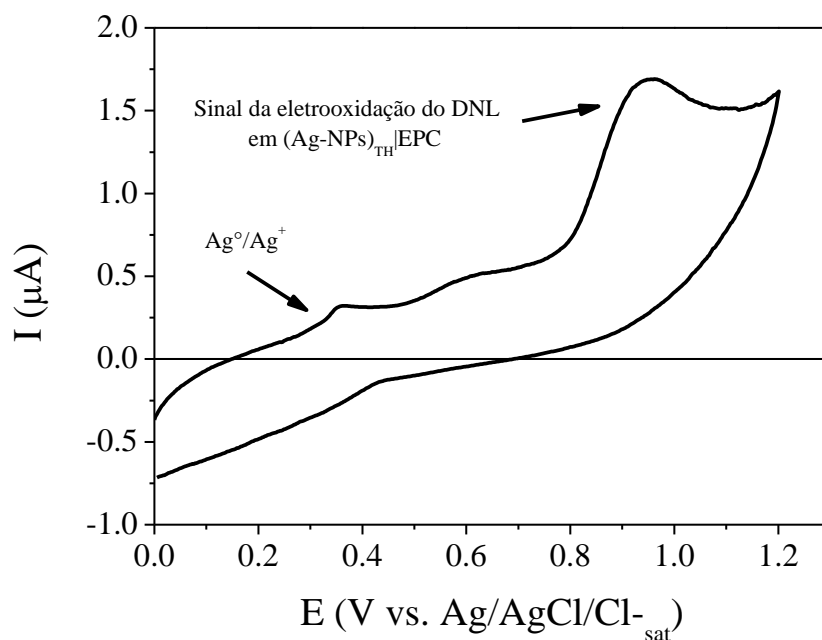
Fonte: Autoria própria, 2019.

Embora o perfil voltamétrico observado na presença de Ag-NPs e (Ag-NPs)_{TH} seja similar, a intensidade dos processos redox foram bem mais intensos no último caso, possivelmente pela maior uniformidade na forma e tamanho dos grãos que, por sua vez, facilita a interação das nanopartículas com outros materiais e amplifica as propriedades desejadas (aumento de área eletroativa, por exemplo) para o material eletródico. Como o aumento de área é uma característica bastante almejada no desenvolvimento de um sensor eletroquímico, uma vez que este efeito tem uma contribuição significativa para melhorar a capacidade de detecção do analito, o sensor (Ag-NPs)_{TH}|EPC foi utilizado como dispositivo de trabalho na construção do método eletroanalítico para a detecção e quantificação de DNL.

5.3. TESTES DE ELETROATIVIDADE DO DIENESTROL

A eletroatividade do DNL sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC foi verificada utilizando-se VC a uma velocidade de 50 mV s⁻¹, em meio de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), para uma faixa de potencial de 0,0 a +1,2 V, conforme indicado na Figura 6. Na presença do analito, é possível verificar um processo de oxidação em +0,95 V, que está relacionado à oxidação irreversível dos grupos fenólicos presentes na estrutura do estrogênio (OCHIAI *et al.*, 2017).

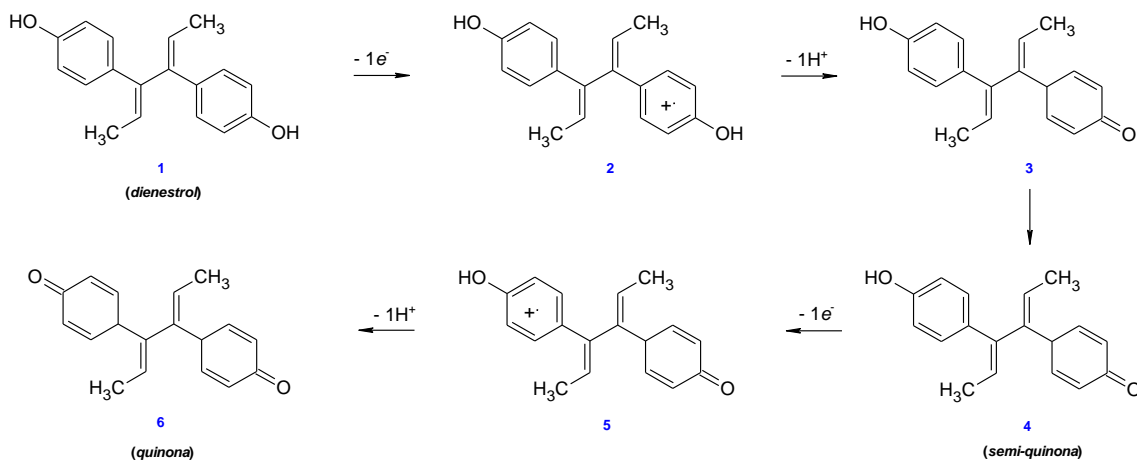
Figura 7: Voltamograma cíclico obtido para o dienestrol ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, em meio eletrolítico de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹



Fonte: Autoria própria, 2019.

De acordo com Lima Filho *et al.* (2019), a simetria estereoquímica e hiperconjugação da molécula favorecem a oxidação simultânea dos dois grupamentos fenólicos no mesmo potencial, através de um mecanismo eletroquímico-químico-eletroquímico que envolve $2e^-$ e $2H^+$. Os mesmos autores ainda esclarecem que, dependendo do material eletrodico e do potencial aplicado, a oxidação do DNL pode ser parcial, produzindo intermediários de semi-quinona, ou completa, resultando na formação de quinonas. Esses produtos podem ser eletrogerados na formar de dímero sobre a superfície do sensor, bloqueando o sinal analítico. Uma descrição destas reações pode ser observada na Figura 8.

Figura 8: Proposição mecanística para a eletrooxidação do dienestrol.

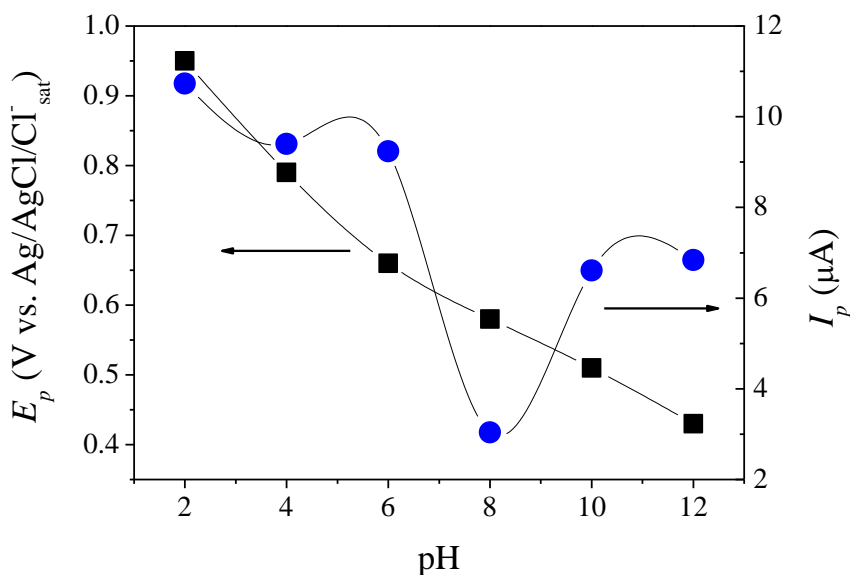


Fonte: Adaptado de Lima Filho et al. (2019).

5.4 ESTUDO DE pH

O pH se constitui como uma das variáveis mais importantes e que influencia diretamente na eletroanálise dos estrogênios sintéticos. Dessa forma, foi verificado a resposta do sensor em relação à eletroatividade do DNL em diferentes valores de pH (2 - 12), conforme pode ser observado na Figura 8. Os valores mais expressivos de I_p foram observados em pH = 2, reduzindo à medida em que o meio se torna mais alcalino. Esse mesmo princípio faz com que o sinal eletroanalítico do DNL se torne mais distante da região de potenciais onde ocorre a oxidação da água, deslocando-se de +0,95 V para +0,65 V, o que torna o processo mais seletivo. Isso ocorre devido as diferenças de eletroatividade das formas protonada e não-protonada molécula de trabalho, que pode variar de acordo com o pKa. O DNL possui dois valores de pKa, representados como $pka_1 = 7,43$ e $pKa_2 = 10,47$ (WEN *et al.*, 2013). Considerando que o aumento de sinal é uma condição limitante para se medir a eficiência de um sensor eletroquímico, por conferir maior capacidade de detecção ao método, foi selecionado pH = 2 como condição ideal para a realização dos experimentos futuros.

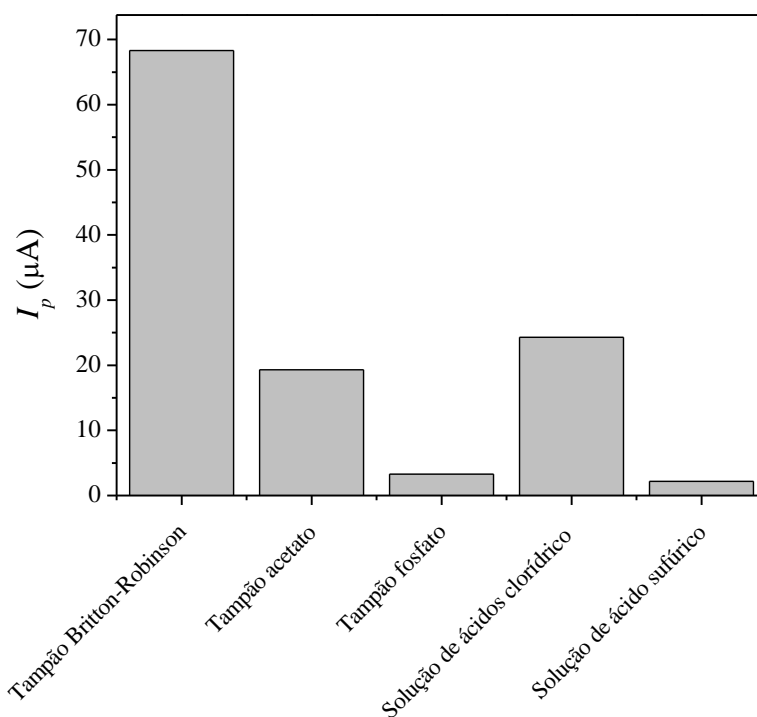
Figura 9: Relação entre pH com as correntes e potenciais de pico registrados para a oxidação do DNL ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre $(\text{Ag-NPs})_{\text{TH}}|\text{EPC}$.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Além do pH e substrato empregado como eletrodo, a escolha do eletrólito de suporte também se constitui como um parâmetro crítico no desenvolvimento de métodos eletroanalíticos, a fim de se obter uma maior reatividade para a molécula de trabalho (AGOSTINHO, et. al, 2004). O eletrólito de suporte pode modificar a termodinâmica e a cinética do processo eletródico, bem como o transporte de massa na célula, influenciando diretamente na intensidade da corrente de pico observado. Neste estudo foram investigadas cinco soluções como eletrólito de suporte: tampão Britton-Robinson, tampão fosfato, tampão acetato, ácido clorídrico e ácido sulfúrico, todos preparados na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e ajustados a $\text{pH} = 2$. Os resultados obtidos foram sumarizados na Figura 10 e demonstraram uma melhor resposta para o sinal analítico registrado em tampão Britton-Robinson, justificando a escolha deste eletrólito.

Figura 10: Valores de corrente de pico registrados para a oxidação de DNL($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) sobre (Ag-NPs)_{TH}/EPC, usando voltametria cíclica a 50 mV s^{-1} .

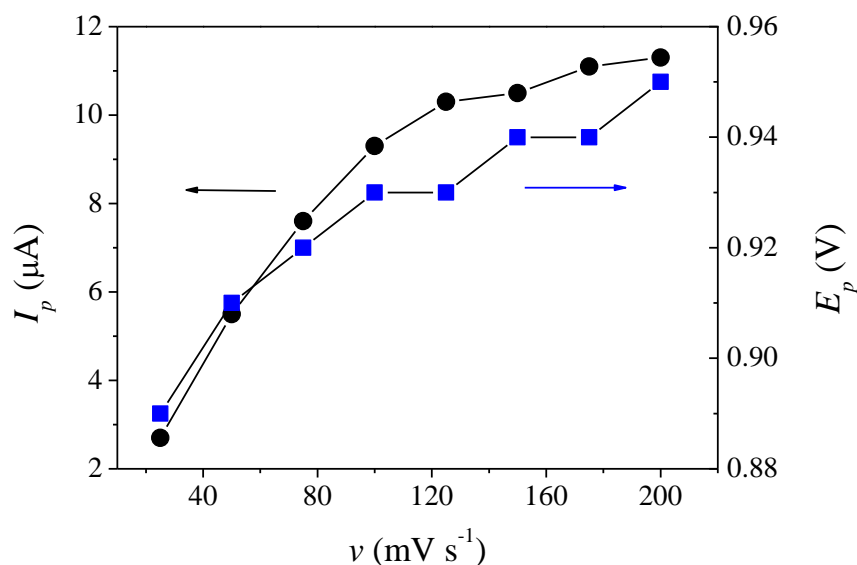


Fonte: Autoria própria, 2019.

5.5. ESTUDO DE VELOCIDADE DE VARREDURA

Para verificar o grau de reversibilidade do processo e a natureza do transporte de massa na superfície do sensor, realizou-se um estudo da eletrooxidação do DNL em diferentes velocidades de varredura (v ; 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mV s^{-1}). Observando a Figura 11, constata-se que o aumento de v provoca um aumento não-linear nos valores de I_p e deslocamento de E_p para valores mais positivos. Segundo os critérios de diagnóstico da voltametria cíclica, esse comportamento é característico de processos redox irreversíveis cuja cinética da reação é controlada por uma etapa adsortiva (RÓZ *et al.*, 2015). Numa primeira análise, esta seria uma importante limitação para o método eletroanalítico, por conta do bloqueio da superfície ativa e perda do sinal analítico. Todavia, verificou-se uma maior resistência a passivação da superfície após a modificação de EPC com (Ag-NPs)_{TH}, de forma que a simples agitação do meio por um período de 30 s era suficiente para renovar a superfície do dispositivo. Este procedimento foi mantido em todos os experimentos subsequentes.

Figura 4: Relação da velocidade de varredura com as correntes e potenciais de pico obtida para a oxidação de DNL ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) sobre $(\text{Ag-NPs})_{\text{TH}}|\text{EPC}$, em meio de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2).



Fonte: Autoria própria

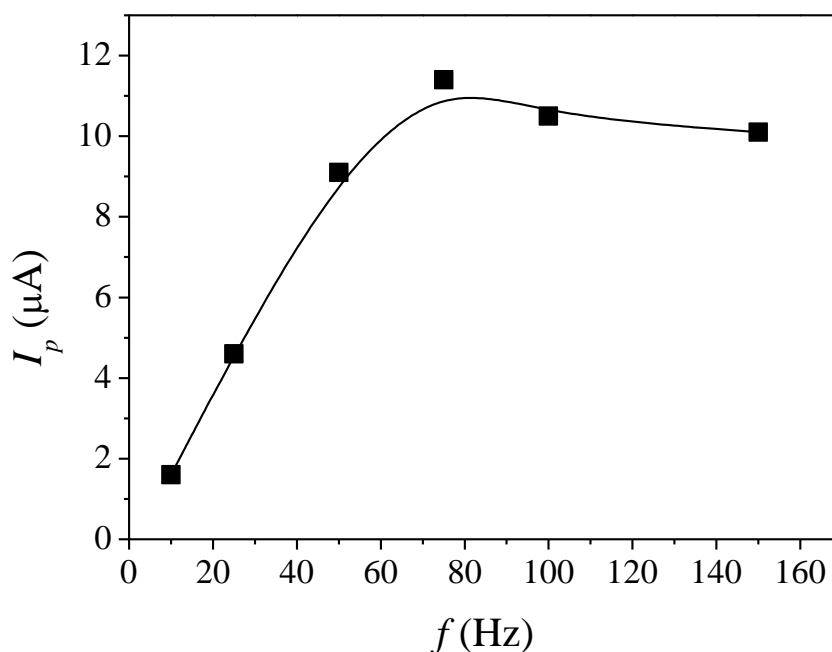
5.6. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS ELETROANALÍTICOS

Na voltametria de onda quadrada (VOQ), a forma da curva de corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_s (incremento do pulso de potencial), que variam de acordo com uma escada de potencial com largura a (amplitude do pulso de potencial), medidos a uma dada frequência (f) ao longo do tempo. A variação de potencial é feita na forma de uma onda, registrada sobre uma rampa gradiente de potencial na forma de escada, gerando um pico simétrico que pode ser utilizado com sucesso para determinações eletroanalíticas (DE SOUZA, MACHADO E AVACA, 2003; MEDEIROS 2018). As correntes resultantes são medidas ao final dos pulsos direto e reverso, de modo que a intensidade da corrente resultante apresenta excelente sensibilidade e alta rejeição de correntes capacitivas, tornando-se mais sensível que as demais técnicas não-pulsadas. Sendo assim, optou-se por utilizá-la como técnica eletroanalítica neste trabalho, a fim de quantificar baixas concentrações do DNL com $(\text{Ag-NPs})_{\text{TH}}|\text{EPC}$.

A frequência de aplicação dos pulsos é considerada como um dos parâmetros mais críticos da VOQ, por estar diretamente relacionada com a velocidade efetiva de varrimento, por meio do produto com o incremento de varredura de potencial ($v = f \times \Delta E_s$). Neste trabalho, a frequência de aplicação dos pulsos foi investigada no intervalo entre 10 e 150 Hz (Figura 12), onde se constatou aumento praticamente linear de I_p até f

= 75 Hz, o que denota cinética relativamente lenta do DNL sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC. Também foi observado um leve deslocamento de E_p para regiões mais positivas devido à passivação da superfície por produtos da reação redox, estando de acordo com as informações obtidas por voltametria cíclica.

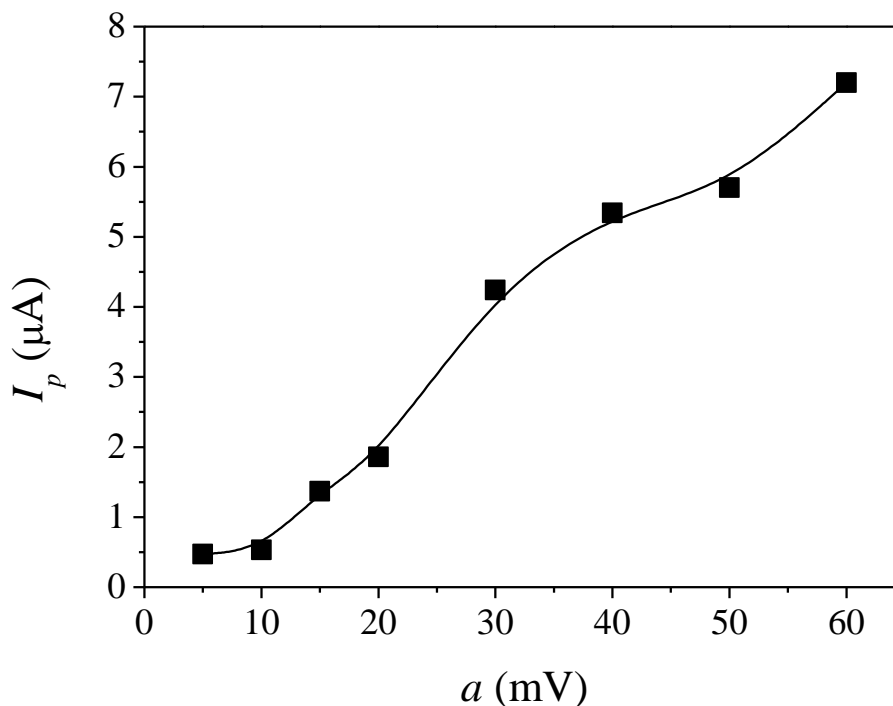
Figura 5: Relação da frequência de aplicação dos pulsos da voltametria de onda quadrada ($a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV) com as correntes de pico obtidas para a oxidação de DNL ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, em meio de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2)



Fonte: autoria própria, 2019.

No caso da amplitude, avaliada entre 5 e 60 mV, observou-se um ganho de corrente não-linear ao aumentar esta variável em toda a faixa investigada, conforme pode ser constatado na Figura 13. Todavia, para valores de $a > 15$ mV, também houve alargamento no perfil voltamétrico do processo, implicando em aumento de $\Delta E_{p/2}$ e perda de seletividade em relação à possíveis interferentes que possam ser eletroativos sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, especialmente aqueles que se oxidam em potenciais eletroquímicos próximos ao do DNL.

Figura 6: Relação da amplitude dos pulsos de potencial da voltametria de onda quadrada ($f = 75\text{Hz}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$) com as correntes de pico obtidas para a oxidação de DNL ($1,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, em meio de solução tampão Britton-Robinson ($\text{pH} = 2$).

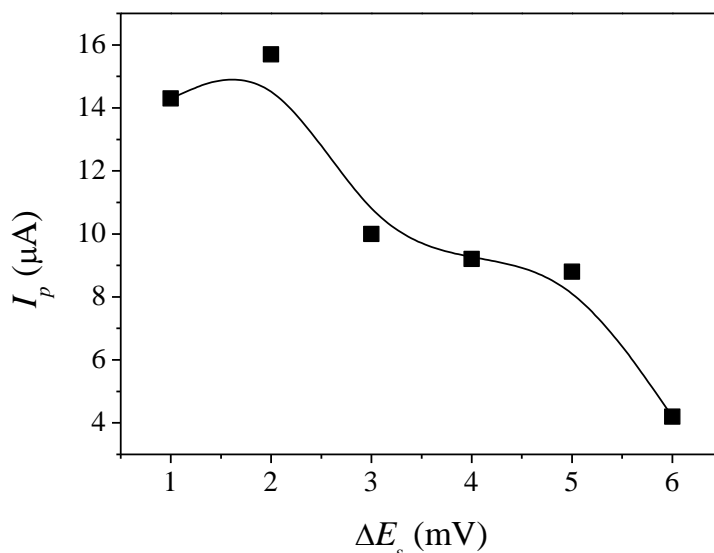


Fonte: Autoria própria, 2019.

No caso do incremento de potencial, estudado entre 1 e 6mV (Figura 14), os valores de I_p reduziram em $\Delta E_s > 2\text{mV}$, havendo também aumento significativo do ruído de sinal em $\Delta E_s \geq 3\text{ mV}$, prejudicando o perfil voltamétrico da reação redox de interesse e dificultando o tratamento estatístico dos dados. Outro fator indesejável foi que o aumento de ΔE_s também favoreceu o deslocamento de E_p para valores mais próximos do potencial de evolução de oxigênio que, além de diminuir a seletividade do método, também dificultou a repetibilidade das medidas.

Diante do exposto, para a construção da curva analítica e futuras aplicações da metodologia proposta, utilizou-se (Ag-NPs)_{TH}|EPC aliado à VOQ nas seguintes condições operacionais: $f = 75\text{ Hz}$, $a = 30\text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2\text{ mV}$.

Figura 7: Relação do incrementode potencial da voltametria de onda quadrada ($f = 75$ Hz e $a = 15$ mV) com as correntes de pico obtidas para a oxidação de DNL ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, em meio de solução tampão Britton-Robinson (pH = 2).



Fonte: Autoria própria

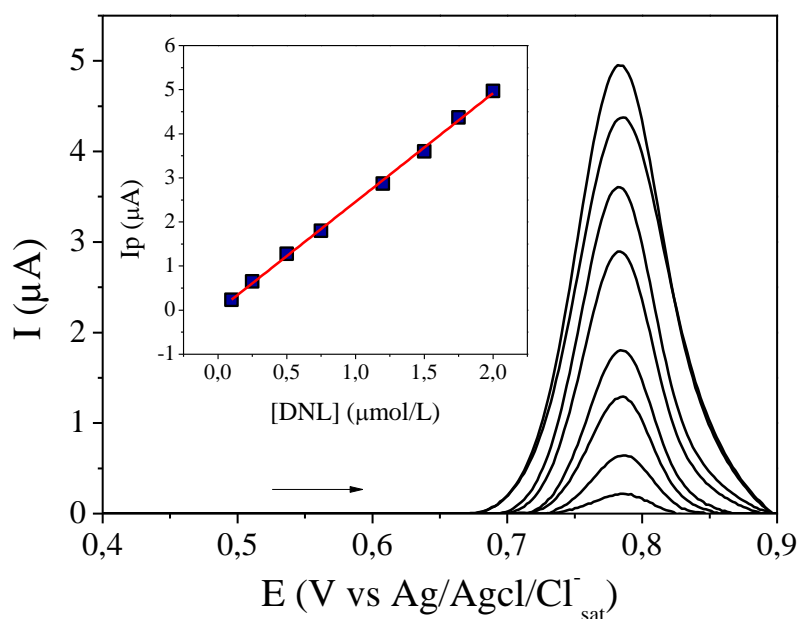
5.7. CURVA ANALÍTICA E FIGURAS DE MÉRITO

Após a obtenção das melhores condições operacionais (solução tampão Britton-Robinson ajustada a pH = 2,0 e 30 s de agitação entre as medidas) e voltamétricas ($f = 75$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV) para a determinação eletroanalítica do DNL sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, foi construída uma curva analítica (Figura 15) a partir da relação linear entre a concentração do estrogênio e os respectivos valores de corrente de pico, cuja representação matemática pode ser descrita pela seguinte equação de regressão:

$$I_p \text{ (A)} = -1,102 \times 10^{-7} + 0,199 \times [\text{DNL}] \text{ (mol L}^{-1}\text{)} \quad \text{equação 04}$$

A faixa linear de concentração estendeu-se de $1,0 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, alcançando um coeficiente de correlação próximo da unidade ($r = 0,9985$), o que configura uma boa precisão (baixa dispersão dos dados amostrados), além de demonstrar que o modelo matemático utilizado na representação da curva analítica é satisfatório para descrever a variância dos dados. Utilizando o desvio padrão dos diferentes valores ($n = 3$) do coeficiente linear e a média aritmética do coeficiente angular, foi possível estimar os valores de LD e LQ do método eletroanalítico como sendo $4,37 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $9,08 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente, demonstrando a elevada sensibilidade do método para a quantificação do estrogênio mesmo em níveis-traço.

Figura 8: Voltamogramas de onda quadrada do DNL ($1,00 \times 10^{-7}$ a $2,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) registrados para a sua oxidação sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC em meio de solução-tampão Britton-Robinson (pH = 2,0), aplicando-se $f = 75$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV.



Fonte: Autoria própria, 2019.

A precisão foi avaliada por ensaios de repetibilidade do DNL ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, feitos no mesmo dia (*intraday*; $n = 10$) e em dias diferentes (*interday*; $n = 5$) com um mesmo dispositivo, sendo que os resultados foram expressos em termos de desvio-padrão relativo (DPR) das medidas. Os valores DPR obtidos para as medidas *intraday* (3,23%) foram inferiores àqueles obtidos no procedimento *interday* (7,55%). Todavia, verificou-se que esta diferença não proporcionou grande variância no valor médio dos dados, sugerindo que a precisão do método foi garantida mesmo em baixas concentrações do analito. Quanto à exatidão, analisada pela repetição do mesmo protocolo eletroanalítico supracitado para a determinação de DNL ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, mas feitas por três diferentes analistas, foi identificado um DPR = 9,3%, o que denota uma elevada acurácia e confiabilidade do método para possíveis aplicações na eletroanálise de DNL em amostras complexas.

6. CONCLUSÕES

(Ag-NPs)_{TH}|EPC possui propriedades eletroanalíticas atrativas para ser utilizado como um sensor, a exemplo da baixa resistência à transferência de carga e elevada área superficial, possibilitando a detecção e quantificação de baixas concentrações de DNL. O estudo tomou por base o processo de oxidação irreversível da molécula do estrogênio, relacionado à oxidação de grupos fenólicos. A reação tem caráter adsorptivo, sendo fortemente afetada pelo pH do meio, com cinética eletródica moderadamente lenta.

Ao utilizar as melhores condições operacionais (solução tampão BR pH = 2,0 e 30 s de agitação entre as medidas) e voltamétricas (VOQ com $f = 75$ Hz, $a = 30$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV) para a determinação eletroanalítica do DNL sobre (Ag-NPs)_{TH}|EPC, obteve-se valores de LD e LQ equivalentes à $4,37 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $9,08 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, respectivamente, além de precisão e exatidão aceitáveis (DPR < 10%) para quantificar baixos níveis de concentração da molécula dos estrogênio. O conjunto das figuras de mérito comprova a viabilidade do método eletroanalítico então desenvolvido para futuras aplicações em amostras reais.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, F. **Piscicultura**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará-IFPA, (2011) 1-216.
- ALLERSTON, L. K.; REES, N. V. Nanoparticle impacts in innovative electrochemistry. [Current Opinion in Electrochemistry](#), v. 10, p. 31-36, 20 ago. 2018.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Química Nova**, 30 (2007) 1-16.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Produção da Pecuária Municipal – 2015. Prod. Pec. Munic., Rio de Janeiro, 43(2015) 1-49.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Balança comercial do pescado 2013. Disponível em: www.mpa.gov.br. Acesso em: abril. 2017
- BRASIL; Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da Pesca 201- Brasil. Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Brasília - DF, (2007) 151.
- CHEN, J.; LIANG, Q.; HU, H.; WANG, Y.; LUO, G.; HU, M.; NA, Y. Simultaneous determination of 15 steroids in rat blood via gas chromatography–mass spectrometry to evaluate the impact of emasculation on adrenal. **Talanta**, 80 (2009)826–832.
- CINCOTTO, F. H. Detecção dos interferentes endócrinos estradiol e estriol em amostras ambientais e clínicas empregando eletrodos modificados com grafeno, nanopartículas metálicas e quantum dots. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 2016.
- CYRINO, J.E.P.; OLIVEIRA, A.M.B.M.S; COSTA, A.B. **Curso: Introdução à Piscicultura**. Homepage. Disponível em: <http://projetopacu.com.br/public/paginas/215-apostila-esalq-curso-atualizacao-em-piscicultura.pdf>. Acesso: 07/04/2017.
- EDWARDS, P. **Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends**. Volume 447, Pages 2–14. 1 October 2015.
- FALONE, S. Z. 179f. Desenvolvimento de Métodos para a Determinação do Hormônio 17 α –Metiltestosterona em Amostras de Água e de Sedimentos de Piscicultura: ensaios Ecotoxicológicos com Cladóceros. **Tese Doutorado**, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2007.
- FAO – Organização Das Nações Unidas Para a Agricultura E Alimentação. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2010.
- FELIZARDO V. O, MURGAS L. D. S, ANDRADE E. S, LÓPEZ P. A, FREITAS R. T. F, FERREIRA M. R. Effect of timing of hormonal induction on reproductive activity in lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Theriogenology**, 77 (2012) 1570- 1574.
- FERNÁNDEZ, H. *et al.* Studies about the adsorption of progesterone (P4) at glassy carbon electrodes in aqueous buffer solution by square wave voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 629, p.133-137, 2009.

GOULART, L. A., GONÇALVES, R., CORREA, A. A., PEREIRA, E. C., MASCARO, L. H. Synergic effect of silver nanoparticles and carbon nanotubes on the simultaneous voltammetric determination of hydroquinone, catechol, bisphenol A and phenol. **Microchimica Acta**, (2017) 1-9.

GOYAL, R. N., GUPTA, V. K., BACHHETI, . Fullerene-C60-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone An anabolic steroid used in doping. **Analytica Chimica Acta**, 597 (2007) 82–89.

GROVER, D.P.; ZHANG, Z.L.; READMAN, J.W.; ZHOU, J.L. A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. **Talanta**, 78 (2009) 1204–1210.

GUIMARÃES, T. S. Detecção e Quantificação dos Hormônios Sexuais 17 b-Estradiol (E2), Estriol (E3), Estrona (E1) e 17 a-Etinilestradiol (EE2) em Água de Abastecimento: Estudo de Caso da Cidade de São Carlos, com Vistas ao Saneamento Ambiental. **Dissertação de Mestrado**, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, 2008.

HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. **FoodChemychal**. 62 (1998) 7-20.

HE X. P., LIAN Z. R., TAN L. J., WANQ J. T. Preparation and characterization of magnetic molecularly imprinted polymers for selective trace extraction of dienestrol in seawater. **J Chromatogr A**. Volume 1469:8-16. Oct 2016.

HOGA, C. A. 95f. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de resíduo de 17β-estradiol em tambaqui por LC-MS/MS. **Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2016.

HONG H., BRANHAM W. S., NG H. W., MOLAND C. L., DIAL S.L., FANG H., PERKINS R., SHEEHAN D., TONG W. Human sex hormone-binding globulin binding affinities of 125 structurally diverse chemicals and comparison with their binding to androgen receptor, estrogen receptor, and α-fetoprotein. **Toxicol Sci**. 143(2):333-48. 2015.

HUTCHINSON, T. H. Reproductive and developmental effects of endocrinedisrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. **Toxicology Letters**, 131 (2002) 75-81.

ISMAIL N. A. H., WEE S. Y., ARIS A. Z. **Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota** **Chemosphere**, 188 (2017) 375-388.

JIN, G.; LIN, X. Voltammetric behavior and determination of estrogens at carbamylcholine modified paraffin-impregnated graphite electrode. **Electrochimical Acta**, 50 (2005) 3556-3562.

JOVANOVSKI V., HOČEVAR S. B., OGOREVC B. **Bismuth electrodes in contemporary electroanalysis** **Current Opinion in Electrochemistry**, Volume 3, Issue 1, Pages 114-122, June 2017.

KOH, Y. K.; CHIU, T. Y.; BOOBIS A.; CARTMELL, E.; LESTER J. N.; SCRIMSHA, W. M. D. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1173 (2007) 81–87.

KUMAR, V.; NAKADA, N.; YASOJIMA, M.; YAMASHITA, N.; JOHNSON, A. C.; TANAKA, H. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, 77 (2009) 1440–1446.

LEE, J.; HYE-MI, S. O.; JEON, E.; CHANG, H.; WON, H.; KIM, Y. H. Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 390 (2008) 1023–1032.

LIMA FILHO, M.M.S.; CORREA, A.A.; SILVA, F.D.C.; CARVALHO, F.A.O.; MASCARO, L.H.; OLIVEIRA, T.M.B.F. A glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles and functionalized multi-walled carbon nanotubes for voltammetric determination of the illicit growth promoter dienestrol in animal urine. **Microchimica Acta**, 186 (2019) 525.

LIMA, C. A. Determinação eletroanalítica do hormônio progesterona em fármacos utilizando o eletrodo de filme de bismuto. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química 97f. 2012.

LIN X.; LI, Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nanoclusters/multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensores & Bioelectronics**, v. 22, p. 253–259, 2006.

MATEJICEK, D.; HOUSEROVA, P.; KUBAN, V. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic–ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. **Journal of Chromatography A**, 1171 (2007) 80–89.

MATEJICEK, D.; KUBAN, V. Enhancing sensitivity of liquid chromatographic/ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens by on-line pre-column derivatization. **Journal of Chromatography A**, 1192 (2008) 248–253.

MEDEIROS, A.S. Eletroanálise do estrogênio sintético z,z-dienestrol em tilápia-do-nylo (*Sarotherodon niloticus*) utilizando eletrodo de diamante dopado com boro. **Dissertação de Mestrado** (Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais), Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 2018.

MORAES, F. C., ROSSI, B., DONATONI, M. C., OLIVEIRA, K. T., PEREIRA E. C. Sensitive determination of 17 β -estradiol in river water using a graphene based electrochemical sensor. **Analytica Chimica Acta**, 881 (2015) 37–43

MORAES, R.R. ; MOURA, S.L. ; SANTOS, M.A.P ; LOPES, J.A.D ; SANTOS, J.A.V SANTOS JÚNIOR, J.R. Estudo Eletroquímico Da Progesterona Sobre Eletrodo Modificado Com Óxido De Cobalto. **Anais do congresso**. 51^o Congresso Brasileiro de Química, São Luiz – MA, 2011.

MOREIRA, F., MARANHÃO, T. A., SPINELLI, A. Carbon paste electrode modified with Fe₃O₄ nanoparticles and BMI.PF₆ ionic liquid for determination of estrone by square-wave voltammetry. **J Solid State Electrochem**, 22 (2017) 1303–1313.

MUNIZ J. A. S. M, CATANHO M. T. J. A, SANTOS A. J. G. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossomamacropomum* (Cuvier, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, 34 (2008) 205-211.

NIE, Y.; QIANG, Z.; ZHANG, H.; ADAMS, C. Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of active sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, (2009) 7071-7080.

OLIVEIRA T.M.B.F., MORAIS. S. New generation of electrochemical sensors based on multi-walled carbon nanotubes. **Applied Science**, 8 (2018) 1925.

OLIVEIRA, T. C. Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos empregando análise por injeção em batelada para a determinação de nafazolina, zinco, feniramina, clorfeniramina em formulações farmacêuticas. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Urubelândia, 2015.

OLIVEIRA, T. M. B. F. Biossensores enzimáticos para detecção e quantificação de carbamatos em amostras de alimentos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2013.

OLIVEIRA, T. M. F; RIBEIRO, F. W. P; CORREIA, A. N.; LIMA NETO, P; MORAIS, S. Laccase-based biosensors for electroanalysis: a review. **Amanda Harris**, (2017) 48-73.

OSTERYOUNG J. G., OSTERYOUNG R. A. Square wave voltammetry - **Analytical Chemistry**, - ACS Publications, 1985.

PAIVA W. D. A. Determinação de imidacloprid utilizando eletrodo de carbobo vítro modificado com nanotubos de carbono funcionalizados. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, 2017.

PANTER, G. H.; THOMPSON, R. S.; SUMPTER, J. P. **Áquatico toxicology**, 42 (1998) 243.

PAULINO M. S, MILIORINI A. B., MURGAS L. D. S, LIMA F. S. M, FELIZARDO V. O. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, 37 (2011) 39-45.

QUEROL, M.; PESSANO, P.; QUEROL, E.; BRASIL, L.; GRALHA, T. **Tecnologia de Reprodução de Peixes em Sistemas de Cultivo**: Indução hormonal através do extrato hipofisário da Palometa. UNIPAMPA, (2013) 8.

RAYMUNDO-PEREIRA, P. A., CAMPOS, A. M., VIVENTINI, F. C., JANEGITZ, B. C., MENDONÇA, C. D., FURINI, L. N., BOAS, N. V., CALEGARO, M. L., CONSTANTINO, C. J. L., MACHADO, S. A. S., OLIVEIRA JR, O. V. Sensitive detection of estriol hormone in creek water using a sensor platform based on carbon black and silver nanoparticles. **Talanta**, 174 (2017) 652-659.

ROCHA C. M. C. da; RESENDE E. K. de; ROUTLEDGE E. A. B.; LUNDSTEDT L. M. **Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira**. Pesq. agropec. bras., Brasília, 48 (2013) 4-6.

ROSATTO, S.S. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2000.

SANTAMARTA, José. A ameaça dos disruptores endócrinos. Revista Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Porto Alegre: v.2, n.3, jul.2001.

SANTOS, K. D. Determinação Eletroanalítica dos Hormônios Estriol e Estrona em Amostras de Formulações Farmacêuticas, Fluidos Biológicos e Alimentos, **Tese Doutorado** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2013.

SCHMID, T.; GONZALEZ-VALERO, J.; RUFLI, H.; DIETRICH, D. R. Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows. **Toxicology Letters**, 131 (2002) 65-74.

SCORVO-FILHO, J. D.; SCORVO, C. M. D. F.; ALVES, J. M. C.; SOUZA, F. R. A. A Tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39 (2010) 112-118.

SERAFÍN, V., AGUI, P., YÁÑEZ-SEDEÑO, PINGARRÓN, J. M. Determination of prolactin hormone in serum and urine using an electrochemical immunosensor based on poly(pyrrrolepropionic acid)/carbon nanotubes hybrid modified electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 195 (2014) 494–499.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; **Principles of Instrumental Analysis**, 5a ed., Harcourt Brace, 1998;

SOARES, C. Análise das implicações sociais, econômicas e ambientais relacionadas ao uso da piscicultura - o caso Fazenda Princesa do Sertão - Palhoça. **Dissertação Mestrado UFSC**, Florianópolis, 2003.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**. 26 (2003) 81-89.

USLU B., OZKAN S. A. Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments - **Analytical Letters**, 2011.

WAISSMANN, W. Health surveillance and endocrine disruptors. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro, 2002.

WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G.; HE, J.; ZHANG, Y. On-line coupling of solid phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, 606 (2008) 194-201.

YAN, W.; LI Y.; ZHAO L.; LIN J.M. Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216 (2009) 7539–7545.

YANTASEE, W.; LIN, Y.; HONGSIRIKARN, K.; FRYXELL, G. E.; ADDLEMAN, R.; TIMCHALK, C. Electrochemical sensors for the detection of lead and other toxic heavy metals: the next Generation of Personal Exposure Biomonitor. **Environmental Health Perspectives**, 115 (2007) 1683-1690.

ZHANG, X., PENG, Y. BAI, J., NING, B., SUN, S., HONG, X., LIU, Y., GAO, Z. A novel electrochemical sensor based on electropolymerizedmolecularly imprinted polymer and gold nanomaterials amplificationfor estradiol detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 200 (2014) 69-75.

ZHOU, Y., JIANG, Y., XIE, G., DU, X., TAI, H. Gas sensors based on multiple-walled carbon nanotubes-polyethylene oxide films for toluene vapor detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 191 (2014) 24–30.